「植物保護新科技研討會」專刊
臺灣省農業試驗所特刊第57號　pp. 35-45 (1996)

植物病毒鑑定及診斷新技術

張　清　安
臺灣省農業試驗所

摘要：植物病毒病很難以傳統之病徵診斷方式加以判別乃眾所皆知之事實。因此病毒病的診斷與病毒種類之鑑定通常需仰賴較特殊之技術才能達成。隨著科技的日新月異，病毒病的診斷與鑑定技術也不斷的推陳出新。本文除就近年來廣為應用之病毒診斷與鑑定技術做一綜合整理外，也將最近開發成功逐漸受到重視的技術加以簡要介紹以餉讀者。最早被應用為植物病毒診斷與鑑定之技術為生物檢定法，此法源自1929年Holmes發現將TMV接種到煙草*Nicotiana glutinosa*時可產生局部壞死斑點，此後利用適當的指示植物接種便一直被應用為主要的病毒鑑定方法。但是受多項因素之影響，生物檢定法於近十年來逐漸式微。1939年由於電子顯微鏡的發明，使得以觀察感病植物體內的病毒顆粒為直接之鑑定依據成為可能。但因電顯之精細與昂貴造價，卻也阻礙了此項技術之全面普及。50年代末期科學家開始利用抗血清檢定法進行病毒病的鑑定與診斷。由於此法具有快速、簡單、敏感與正確的各項優點，至今仍為病毒診斷與鑑定的主要技術。由於科技的進步，血清檢定法由最早期的沈澱法開始，不斷地被科學家改良成為各式各樣適合不同狀況使用的方法。其中較值得一題的是免疫擴散法(immunodiffusion)，免疫電顯法(SSEM)，免疫點漬法(immunoblotting)，組織壓片法(tissue printing)，螢光免疫法(immunofluorescence)，ELISA，RIPA及西方轉漬法(western blotting)等。早期的抗血清反應只有利用抗體與抗原(即病毒)二者反應後所產生的沈澱物有無來加以判斷。自從1977年 ELISA發展出來以後抗原與抗體的反應可以透過與抗體先行聯結的酵素或其他標識物質如放射物質，螢光物質或化學光物質而將反應的訊號加以擴增。此類訊號可以透過訊號接收機加以記錄並可進行定量與定性分析，因此現階段的抗血清檢定法之敏感度與實用性更形提高，成為病毒診斷與鑑定方法的主力。除了利用抗體所進行之診斷方法以外，近十年來由於遺傳工程生物技術之快速發展，病毒診斷與鑑定也逐漸步入核酸鑑定時代。例如核酸探針(DNA probe)檢定技術就是其中之一種。此法乃利用與病毒核酸互補的一段核酸片斷做為試劑使其與供測病毒核酸發生雜配(hybribization) 反應，其反應之結果以放射性或非放射性物質加以偵測出來。利用核酸探針偵測病毒的敏感度顯著高於抗血清檢定法。不過由於前者供測之標本通常需經繁複的核酸抽取工作，較之簡單易行的抗血清檢定法，其未來的普及性仍有待觀察。爾後1987年Kary Mullis 發明了核酸片斷複製聯鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，此法可將一目標核酸片斷加以重複複製，因此在短時間內即可將其擴增至可偵測的濃度。其敏感度高出現階段所有的病毒檢定法甚多，不過由於此法使用時必需對欲偵測之核酸序列有所了解才能設計出適當引子(primer)供檢測之用，因此全面使用仍有所限制，而且由於試驗所需之酵素甚貴可能也會限制其全面普及。總之利用病毒核酸為偵測目標的診斷方法可預測地將會繼續不斷地被開發出來，許多過去認為不可行的目標，在可見的未來將會陸續被突破，希望日後病毒診斷與鑑定工作將不再是一項繁複而困難的工作。

關鍵詞：病毒、植物病毒、診斷、鑑定。

前　言

病毒侵入寄主植物體後通常會形成不可回復之感染關係(irreversible infection)[6, 26]。感染後之植物體大部份細胞內均會有病毒顆粒存在，此種系統性的感染程序常會導致寄主植物之生長勢(vigor)，產量(yield)及品質(quality)受到不定程度之影響。由於目前仍無法以藥劑之處理復原感染病毒植株，而只能以消極之預防方法，防止進一步之傳染而避免危害擴大。因此病毒病之正確診斷及病毒種類之鑑定以了解其傳播方式，便成爲控制病毒病害之先決條件[23]。在早期，植物病毒病害之診斷通常是仰賴病徵之判別來進行[6, 23]。然而隨著研究人員經驗之累積，已發現病徵診斷之不可靠性。因爲植物感染病毒後並不一定會顯現肉眼可資辨視之徵狀，而且有很多因環境不適，微量元素缺乏或過量，其他微生物感染，甚至昆蟲危害等因素也可能造成類似病毒病的徵狀。因此爲了正確診斷病毒病之感染，不能只依靠病徵之判斷，而最好能利用更敏感與專一之方法進行檢定才能加以確認[18]。如果要進一步鑑定感染病毒之種類作爲防治之參考，則更無法以病徵之差異作爲判別之依據。因爲不同病毒常會造成類似之病徵，而同一病毒由於環境或寄主品系之差異也會造成絕然不同之徵狀[18, 19]。因此發展其他較具專一性之鑑別方法已成爲近年來病毒學研究之一項重點。目前可用於診斷病毒病之方法非常多，有經驗之研究人員可以依據不同狀況之需求選擇適合的方法來應用，但對於初入門的工作人員而言，面對雜陳於文獻上之各種方法則常會無所適從。此種狀況會導致部份人士過度追求新奇，因而捨近求遠，去簡追繁，反而造成事倍功半或徒勞無功甚至造成錯誤判別而茲事體大。一般而言，用來診斷病毒病之方法依其功能可分爲二大類，其中一類較適合病毒之檢定，可精確的判斷出檢體中病毒之有無，但其結果較不適合作爲判別病毒種類之依據。反之，有些技術則適合專供鑑別病毒種類之用，然而因步驟繁瑣，無法做爲大量樣品之檢查方法。總之，不同之病毒檢查技術均各有其優缺點與限制，研究者必需依據不同狀況與需求選擇適當的技術加以應用。因此對於對於各項技術應了解掌握其特性，方能於面臨不同需求之狀況下知所選擇。以下筆者將就近年來廣爲應用之病毒診斷與鑑定技術做一綜合整理，另外也就最近開發成功逐漸受到重視的技術加以簡要介紹供研究同好參考使用。

病毒病之鑑定及診斷技術

生物檢定法

生物檢定法是最早被應用於植物病毒診斷與鑑定之方法[6, 23]。此法源自1929年Holmes 發現以機械摩擦方式將菸草嵌紋病毒(TMV)接種到煙草(*Nicotiana glutinosa*)葉片上，可產生局部壞死斑點。此後利用適當的指示植物接種，便一直被應用爲主要的病毒鑑定方法[6, 23]。此乃利用病毒在不同寄主上造成判別性病徵之特性，以人爲方式將未知病毒接種到鑑別性寄主(differential hosts)上，視其產生之反應與已知病毒對照後加以鑑定。但是影響接種成功與否及接種後病徵之表現的因素太多，此法所得結果常無法作爲充分之鑑定證據。加上許多病毒之人工接種十分困難，或病徵之表現耗費時日，或鑑別性寄主植物難求，或栽培費時費工，均使得生物檢定法之效率與正確性受到頗多質疑，因此此法於近十年來已逐漸式微。不過由於生物檢定之專一性與敏感性仍爲目前許多常用技術所不及，因此在病毒之分類與鑑別程序上生物檢定結果仍爲必須列爲參考之標準之一。

電子顯微鏡觀察法

1939年電子顯微鏡發明成功後，使直接觀察感病植物體內的病毒顆粒作爲鑑定依據成爲可能[10]。但是對於顆粒形態大且容易辨視之病毒而言，利用電顯觀察判別病株簡單易行。然而對於小型病毒而言，由於在電顯下不易與寄主之成分如核醣體區別，並不適合用電顯觀察法進行檢定。而且很多因素如採樣數少，病毒濃度不均及人爲操作經驗等都有可能影響觀察之結果。故常有觀察之結果看不到病毒顆粒，卻無法斷言該樣本確屬健全植物之窘境。何況電子顯微鏡造價昂貴必須專人負責操作，也是此項檢定方法難以普及化之主要原因。因此電子顯微鏡觀察法較不適合作爲病毒檢定之依據。然而此法卻是現階段所有病毒診斷方法中唯一能夠解讀病毒顆粒型態及大小者，故仍被視爲提供鑑別及分類病毒種類依據之必要方法[10]。除了觀察病毒顆粒型態外，電顯也可被用來觀察經過超薄切片之罹病組織細胞之病理變化，尤其對於病毒感染後所形成之內含體或病毒聚合體之構造亦爲鑑別病毒之重要依據[9]。

光學顯微鏡觀察法

此法乃1977 年由美國佛羅里達大學 Christie and Edwardson 所發表出來之方法[9]，其主要原理在於利用染色的方法將病毒粒子於寄主細胞中所聚合而成，或者由病毒所合成之蛋白質所聚合而成之內含體 (inclusion body) 加以染色區別，使之在光學顯微鏡下能由肉眼加以辨視，再根據不同病毒所形成之特殊內含體之型態及組成分(譬如核酸或蛋白質) 加以歸納分析使之成爲鑑別病毒之一種依據[16]，此方法之發展主要是爲了克服利用電子顯微鏡時所遭遇之不普及與操作不易之缺點。就受過訓練有經驗之操作人員而言，在短時間內即可判讀分類受檢之病毒至病毒群(group)或屬(genus)之層次。但是對一般研究人員而言，若無良好之經驗背景，則視而不見的仍大有人在。加上技術本身較適合應用於樣品數少的情況，無法適用於大量樣品之檢定，因此此項技術目前通常被界定爲協助病毒分類與鑑別之參考方法，在檢定上則較少使用。

抗血清檢定法

50年代末期科學家開始利用抗血清檢定法進行病毒病的鑑定與診斷[11,13,39]。此法之原理乃基於動物體之免疫系統對侵入體內之外來高分子物質(抗原) 可以產生專一性之對應蛋白質(抗體)，而抗體可與刺激其產生之抗原發生專一性之結合。因此科學家將由感病植物上所抽取純化之病毒，注射於動物體內，使之刺激其免疫系統產生對應之抗體蛋白質，然後將此抗體分離純化出來，作爲檢定病毒感染之試劑。當抗體與未知感染與否之植株汁液接觸時便可找尋其相對應之病毒並與之結合，透過此種緊密的結合科學家即可判定植株是否爲病毒感染者。而且因爲抗原抗體反應屬專一性結合，因此依據使用之抗體種類便可判斷出感染之病毒類別。由於此法具有快速、簡單、敏感與正確的各項優點，至今仍爲病毒診斷與鑑定的主要技術[19]。血清檢定法目前已被科學家針對不同需求改良成多種適合不同狀況使用的方法。其中較值得一題的是免疫擴散法(immunodiffusion)[32]，免疫電顯法(SSEM)[15,27]，ELISA[11,12]，免疫點漬法(immunoblotting)[31]，西方轉漬法(western blotting)(36)，RIPA(37,38)，及免疫螢光法(immunofluorescence)[8,39]等。

1. **免疫擴散法** (SDS-immunodiffusion test)

此法乃於含有12ml 0.8% 瓊脂(Agar) 之9 cm培養皿中打上直徑0.5 公分之孔穴，每組反應

七個孔穴，中央一個而周圍等距排列六個，然後將待檢之植物葉片磨汁加入周圍之孔穴中，而中央之孔穴則加入抗血清，經8-12 小時後即可觀察結果，依中央孔穴與周圍孔穴間產生白色沈澱帶做爲判別正反應之依據。早期的擴散反應所使用的供測植物汁液通常只有將病葉以緩衝溶液磨碎而已，此種方法只能檢測小型顆粒如球形病毒，對於大型如桿狀或絲狀病毒而言則無法適用。因爲大型病毒無法順利在瓊脂中擴散而無法與抗血清發生反應。但1976年Purcifull與Batchlor發表了一系列方法，終於解決了此項問題[32]。他們在瓊脂中加入0.5% SDS，又在製備反應汁液時以1.5%SDS處理，並利用加熱法促使病毒顆粒解離成爲鞘蛋白基本單位(subunit)之溶液，而能順利地在瓊脂中擴散與血清產生沉澱反應。因此不管何種大小之病毒均能以此方式加以檢測。而且此法最大之優點是可以依據沉澱帶之型式而測出二種病毒之血緣關係，這是其他常用之血清檢測法所不及的地方[32]。加上此法所使用之材料及器皿均極爲簡單，可稱是一項經濟有效之方法。其唯一之缺點是敏感度稍低，對於一些病毒濃度較低的植物樣品，可能無法成功加以檢出。

2.**酵素聯結抗體檢定法**(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, **簡稱**ELISA)

早期的抗血清檢定法只能利用抗體與抗原二者結合後所產生的沈澱來加以判斷，故其敏感度常因病毒濃度不足之影響而無法提升[39]。自從1977年 ELISA 發展後，抗原與抗體的反應可以透過與抗體先行聯結的酵素或其他標識物質如放射物質，螢光物質或化學光物質而將反應的訊號加以擴增。此類訊號可以透過訊號接收機加以記錄並可進行定量與定性分析，使其敏感度與實用性更形提高，成爲病毒診斷與鑑定方法的主力[4, 11]。ELISA乃利用 Polystyrene 材質所製成之96 孔穴盤進行血清反應，標準之ELISA又稱爲直接法(direct ELISA)或雙三明治法(double sandwitch ELISA)[12]。首先是將抗體球蛋白(IgG) 吸附固定在反應盤之孔穴中，其次再加入待檢之植物汁液使其與抗體充份反應，2-3小時後將汁液洗去，再加入已被酵素標定之IgG 溶液，若孔穴中有病毒被吸附在盤上之IgG捕捉固定時，則標有酵素之IgG會進一步與病毒發生專一性反應而形成IgG-病毒-IgG-酵素之複合體，當最後加入適當之酵素基質(subtrate)時則會發生分解反應而產生顏色之變化。呈色反應之強弱，可藉由儀器加以判讀並且分析其結果，因此正反應之判別十分客觀乃是此法之最大優點，而爲其他病毒檢定法仰賴操作人依主觀經驗判定所不及[11]。除了抗原與抗體之反應利用標識在抗體上之酵素予以擴增是一大特色外，將抗體或抗原吸附在固態的物體上，使反應能在固定之位置上被偵測則是ELISA的另一項重大突破。ELISA所使用的吸附物質是由polystylene所製成的96孔穴盤，可以同時進行96個樣品的檢定，工作效率很高。另外ELISA所使用之抗體稀釋倍數高，在血清的使用上遠比前述之擴散法經濟，加上其敏感度與結果重現性均十分優異，因此ELISA 早被公認爲最適合專供檢定大量樣品之方法[4]。近年來ELISA 由早期的直接將酵素標定在抗體上的直接法，已蛻變爲各式各樣適合不同需求的修正法(modified method)。其中最值得一提的是將酵素標定在可與抗體產生專一性反應的二次抗體(secondary antibody)上的修正法[7]。此種標定酵素之二次抗體並不需由研究人員製備而可向專門廠商購買，不僅節省研究人員之時間且由於品質穩定，使得反應結果之重現性更形提高。此種修正法吾人通稱爲間接反應法(indirect ELISA)。文獻上有關ELISA之步驟與論著相當多[4,11]，讀者可以自行參考詳加研究。

3. **免疫點漬法**(Immuno-blotting)

此種檢定法嚴格說來應可列為ELISA之一種修正法，其原理與間接ELISA完全相同[2,20,31]。二者之差異在於點漬法是將待檢植物之汁液直接滴在特殊材質之紙膜(membrane)上，此種紙膜即相當於ELISA的反應盤，可將植物汁液中之各種成份吸附固定，便於後續抗體之反應。最常用之紙膜是硝化纖維(nitrocellulose membrane)，近年來又有多種不同材質之紙膜已商業化銷售中。不同材質之紙膜分別適合不同狀況使用，讀者應參考其產品說明才能適當加以應用。免疫點漬法有時因樣品處理方式之不同而被稱為組織壓片法(tissue printing)等[25]，事實上其基本原理是完全一致的。此類方法與ELISA最大的差異在於 immuno-blotting 可隨樣品數之多寡而調整紙膜之大小，故可適應不同大小樣品數之需求。而不會如ELISA受限於反應盤之大小，僅適合檢查大量的樣品。換句話說即點漬法比ELISA對樣品數的多寡有較佳的彈性。至於反應敏感度與結果之重現性則二者間並無太大差異。另外，ELISA所得之呈色反應為溶液狀態，故可利用機器判讀顏色之深淺。而點漬法之呈色反應屬於一種不溶性之著色，故只能以肉眼判別而無法藉重儀器之判讀，因此其正負反應之判斷較為主觀。不過此項缺點近來已因雷射光之應用而被改善，日後點漬法之結果亦將可被數位化，增加結果判斷之可靠性。

4. **免疫電顯法**(Immuno-electron microscopy, **簡稱**IEM)

由名稱上可看出此方法乃電顯觀察與血清檢定的綜合法。依進行程序之不同可將此法細分成：

a. 修飾法(Decoration method)

此法乃將病毒先吸附固定於電顯銅網上，再加入抗體使之與病毒反應[27]。正反應之病毒顆粒表面會因抗體之結合而在電顯觀察下呈現薄層霧狀構造。而負反應者則維持原來外型。此法最主要是被應用在研究病毒間之血緣關係[27]，或檢查植株中是否有不同病毒複合感染。在大量樣品之檢定上較不適用。

b. SSEM (Serological specific EM)

此法之執行程序恰與修飾法相反[15]。先在銅網上將抗體固定，再與待檢之植物汁液反應。在正反應之銅網上即可觀察到多數被抗體捕捉 (trapped)之病毒顆粒。此法不僅可被用來研究病毒間的血緣關係，而且適合作為檢定病毒感染之用，根據報告其敏感度相當高，執行步驟也算簡易[15]，唯一之缺點是電顯不易取得與操作經驗之限制。

5. **西方轉漬法**(Western blotting)

此法之原理與點漬法完全相同[36]，二者之差異僅在於western blotting之樣品在吸附到紙膜前乃先經電泳(electrophoresis)分離，再利用電泳或其他方式將分離後蛋白質轉漬到紙膜上，爾後所進行之抗體反應則與點漬法完全相同[36]。此法之優點在於可觀察與抗體發生專一性反應之標的蛋白質之數目及分子量，以協助病毒種類之鑑別。western blotting 由於步驟較點漬法繁瑣，故通常不被用於大量樣品之篩檢，而僅供少量樣品鑑定病毒種類之用。

6. **免疫螢光法**(Immunofluorescence test)

免疫螢光法之基本原理與ELISA完全相同，二者差異在於標識物質不同而已[39]。螢光法所用來標定抗體之螢光物質種類很多，較常用的是FITC及rhodamine，但近年來已有多種物質被開發應用於此用途上。螢光物質被標定在抗體上而與抗原病毒反應結合後，可使病毒在特殊波長之光波下被激發，產生肉眼可視之螢光。因此在顯微鏡下即可判斷出細胞中病毒

聚合之位置。利用對應病毒所合成之其他非構造性蛋白之抗體，也可偵測出此類蛋白在感染過程中所產生之位置及移動之過程[7, 8]。因此螢光抗體技術之開發對增進學界就病毒感染過程之了解貢獻不少。不過此項技術由於步驟繁瑣較少被用來做爲大量樣品之篩檢。

7. **快速免疫濾紙檢定法**(Rapid Immunofilter Paper Assay, 簡稱RIPA)

上述六種血清檢定法中除了擴散法在操作上較爲簡易外，其餘五種方法雖然在敏感度上較爲優異，但是大都步驟繁瑣，或者需要使用精密貴重儀器才能進行。因此上述方法均只能在實驗室內由專人負責操作判讀，而無法適用於田間現場植物病毒病之立即檢測。此項需求一直到1992年日本東京農大津田教授之研究發表後才露出曙光[37, 38]。津田等人利用紅白兩種不同顏色之乳膠粒(latex beads)，分別吸附相同的抗體。將白色乳膠粒於8 x 0.5 cm之濾紙條上距頂端1.5cm 處塗抹成一細線。陰乾後此濾紙條可於室溫乾燥箱中儲藏達一年以上。測定病毒時將紅色乳膠粒稀釋於緩衝溶液中並與待檢之植物汁液等量混合。若汁液中有標的病毒存在，則病毒會與吸附在紅色乳膠粒上的抗體反應而被乳膠粒捕捉。當後續把含有白色乳膠粒的濾紙條浸入上述溶液時，捕捉有病毒之紅色乳膠粒可藉由毛細現象往上移行，當接觸到白色乳膠粒時，紅白乳膠粒與病毒即可結合形成複合體，而在塗抹白色乳膠粒之部位逐漸累積形成肉眼可視之紅色細線。反之，若待檢汁液中無病毒存在，則紅色乳膠粒無法與白色乳膠粒結合，即不會在該處累積成紅線。根據津田等之結論，此一方法適合小型病毒如CMV及TMV之檢測，對於大型病毒而言，由於其在濾紙上之滲透移行性不佳，故並不適用[38]。RIPA 檢定之靈敏度與ELISA不相上下。此法由於可以在現場直接檢測植株，所使用之材料除乳膠粒稍貴外，其餘均極簡單便宜。測定結果可以肉眼直接判讀，亦可以700nm光波掃描，因此十分簡易與客觀，可稱是一項極適合現場人員應用的方法。其最大的缺點在於並非所有病毒均能適用，有待研究人員繼續開發改良以增加其適用性。

鞘蛋白trypsin裂解圖譜比較

Shukla等人於1988年提出一項可以精確地鑑別病毒種類的方法[35]；將純化之病毒鞘蛋白以蛋白脢trypsin裂解處理隔夜後，以HPLC將裂解後蛋白鏈片斷分離30分鐘，再與已知病毒經相同方式處理之鞘蛋白裂解圖譜比較；當彼此序列相似度(sequence identities)超過90% 時則屬相同病毒之不同系統(strain)，若相似度低於75% 則被視爲不同之病毒。如今由於大多數已知病毒之鞘蛋白trypsin 裂解圖譜均已被建立成完整之資料庫，因此當一未知病毒經此方法處理後，即可與已知圖譜比較而鑑別出病毒之身份。此方法之精確度與結果重現性極高，加上操作簡單快速目前已廣爲應用爲快速鑑定病毒種類之方法[35]。過去許多不易分別的病毒系統，均已因此法而確定了分類地位[35]。

雙鏈型核醣核酸dsRNA圖譜之比較

許多RNA病毒在感染寄主植物的過程中會合成雙鏈型核醣核酸(dsRNA)[29]。Morris and Dodds [28]應用合成CF-11樹脂可以將植物組織中之dsRNA片斷在不同濃度之酒精下加以分離，所得試料再利用電泳加以分析。由於不同病毒屬具不同之核酸組成與表現方式，其dsRNA片斷種類，數目及分子量大小均會有所差異，因此利用此法可以快速精確地判別不同的病毒屬(genus)[29]，但對於同屬之不同種(species)病毒而言，此法則無法區別。此方法特別適用於鑑定不易分離的木本植物或菌類病毒(fungal viruses)，此類病毒由於接種不易或因濃度低不易純化分離，常難以鑑

別分類。此法可於短時間內快速加以鑑定至病毒屬之層次[29]。

核酸探針檢定法(DNA probe indexing)

除了利用抗體所進行之診斷方法以外，近十年來由於遺傳工程生物技術之快速發展，病毒診斷與鑑定也逐漸步入核酸鑑定時代。例如核酸探針 (DNA probe) 檢定技術就是其中之一種[5,17,40]。此法乃利用與病毒核酸互補而且標定有放射性或非放射性物質的一段核酸片斷做爲試劑，使其與供測病毒核酸發生雜配(hybribization) 反應，其正反應之結果則可以偵測其放射性或以標定酵素之抗體加以偵測出來。核酸探針偵測病毒的敏感度顯著高於抗血清檢定法[40]。不過由於偵測核酸時的抽取工作較爲繁複， 遠不如一般抗血清法簡易。加上如果使用放射性元素標定時，在使用上又有安全性之考量。因此核酸探針檢定法目前大都使用在某些專業研究室針對少量重要標本進行檢定，其普及性尚不如抗血清檢定法。晚近有些非放射性之標定法被發展出來，包括呈色法及冷化學光法等等。但是此類方法目前仍有背景值偏高及敏感度降低的問題，有待學界繼續努力開發修正，使之成爲更安全敏感且簡便易行之方法。

聚合酶聯鎖反應檢定法

1987年Kary Mullis發展出一種極具強大功能之核酸偵測法，稱爲polymerase chain reaction (PCR)[24]。此法乃利用目標核酸片斷之上下游序列以人工方法先各合成一含10-20個核苷酸的片斷。利用此二片斷當做引子(primer)在含有核苷酸及聚合酶(polymerase)的情況下，可以發生聯鎖複製的反應而將該目標核酸序列於短時間內快速增殖。而後再用電泳法將複製之核酸片斷加以分析[24]。由於設計引子對的時候已掌握該標的核酸片斷的分子量大小，因此由電泳分析結果即可由與預測相符之核酸片斷之出現與否，判斷出是否爲病毒感染之植株。此偵測法之靈敏度是所有已知的檢定法中最高者；據估計高出ELISA 10^7倍以上，而比DNA probe高出10^4倍。但是也由於此一偵測法極端敏感，故操作時稍一不慎有所污染，即可造成假正值(false positive)而引起誤判，應用時不可不慎。另外，此項技術使用前必需對標的病毒之核酸序列有所了解才能執行，因此對於尚未完全研究透徹或是研究難度較高的病毒，便無法立即著手檢查爲其較大之限制。又技術操作時需要有豐富經驗，優良之實驗室設備及經費預算，也是PCR檢定法全面普及之另一項限制。不過PCR自從1987年發展自今，許多在病毒檢定上被視爲高難度的問題均已被其突破，其中值得一提的是：

1. 利用系統專一性核酸序列引子對(strain specific primer pair)，可以在病毒族群中立即偵測出特殊系統之存在[22, 33, 34]。
2. 利用所謂的病毒屬或種專一性引子對(genus or species specific primer pair)，可以快速鑑別標的病毒之分類地位[21, 24]。
3. 配合限制酶分解技術可以在短期間了解病毒系統間核酸序列之差異[14]。
4. 在不需選殖(cloning)標的核酸之前題下可以快速合成該核酸片斷之核酸探針[1]。
5. 可以快速選殖標的核酸片斷，供進一步之分析研究[30]。

在研究人員不斷積極的努力下，PCR已經被證實具有超强的病毒檢定能力與不可限量的開發潛力。相信許多過去認爲極端困難的目標，在可見的未來必將逐一被突破。PCR 之發展只是一項例證，在人類無止盡的想像空間下，似乎困難的事只是一個過程而已，絕非是必然。

結語

由病毒檢定法發展之歷史可以看出技術發展由早期的由簡入繁，而又逐漸蛻變爲轉繁爲易之趨向。事實上各項技術之發展均有其各自不同之需求背景。孰優孰劣，很難遽下結論。所謂戲法人人會變，各有巧妙不同。病毒之檢定亦是如此，用的巧用的恰當，才是檢定病毒的極致。當然也有部份人士喜好追求新奇，爲發展新的檢定技術，追上時代潮流而向前衝刺。然而筆者深信，病毒檢定與診斷之目的在於準確地診斷出病毒種類與存在的有無，必須能達成此目的，而又能節省人力、物料、設備與時間等資源的技術才是最符合人類需求的技術。

參考文獻

1. Akin, A., Wu, C. C., Lin, and T. L., Keirs, R. W. 1993. Chemiluminescent detection of infectious bursal disease virus with a PCR-generated non-radiolabeled probe. J. Vet. Diagn. Invest. 5:166- 173.
2. Banttari, E. E., and Goodwin, P. H. 1985. Detection of potato virus S, X, and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot- ELISA). Plant Dis. 69:202-205.
3. Bariana, H. S., Shannon, A. L., Chu, P. W. G., and Waterhouse, P. M. 1994. Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. Phytopathology 84:1201-1205.
4. Bar-Joseph, M., and S. M. Garnsey. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Principles and applications for diagnosis of plant viruses. pp.35-59 In K. Maramorosch and K. F. Harris, eds. Plant diseases and Vectors:Etiology and Epidemiology. Academic Press, N. Y.
5. Bijaisoradat, M., and Kuhn, C. W. 1988. Detection of two viruses in peanut seeds by complementary DNA hybridization tests. Plant Dis. 72:956-959.
6. Bos, L. 1983. Introduction to plant virology. L. Bos. ed. Longman, London and New York, 160 pp.
7. Chang, C. A. 1986. Bean yellow mosaic and clover yellow vein virus: Purification, characterization, detection and antigenic relationships of their nuclear inclusion proteins. Ph. D. dissertation. Univ. of Florida, 135 pp.
8. Chang, C. A., Purcifull, D. E., Hiebert, E., and Edwardson, J. R. 1986. Immunofluorescence evidence for the origin of nuclear inclusion and cytoplasmic crystals induced by bean yellow mosaic virus.Phytopathology 76:1061.
9. Christie, R. G., and Edwardson, J. R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Fla. Agric. Exp. Stn. Mongr., Ser. 9, 155 pp.
10. Christie, S. R., Purcifull, D. E., Crawford, W. F., and Ahmed, N. A. 1987. Electron Microscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissue samples with appendices on negative staining techniques. Fla. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 872, 45 pp.
11. Clark, M. F. 1981. Immunosorbent assays in plant developments in plant virology. Ann. Rev.

phytopathol. 19:83-106.
12. Clark, M. G., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. of Gen. Virol. 34:475-483.
13. Clark, W. R. 1983. Experimental Foundations of Modern Immunology. 2nd ed. John wiley Sons, N. Y. 453 pp.
14. Dekker, E. L., Derks, A. F. L. M., Asjes, C. J., Lemmers, M. E. C., Bol, J. F., and Langeveld, S. A. 1993. Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause tulip-breaking. J. of Gen. Virol. 74:881-887.
15. Derrick, K. S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. Virology 56:652-653.
16. Edwardson, J. R., and Christie, R. G. 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. Ann. Rev. Phytopathol. 16:31-55.
17. Frenkel, M. J., Jilka, J. M., Shukla, D. D., and Ward, C. W. 1992. Differentiation of potyviruses and their strains by hybridization with the 3' non-coding region of the viral genome. J. of Virol. Methods 36:51-62.
18. Gibbs, A. J., and B. Harrison. 1976. Plant Virology. The Principles. Halsted Press (John Wiley), N. Y. 292 pp.
19. Hamilton, R. I., Edwardson, J. R., Francki, R. I. B., Hsu, H. T., Hull, R., Koenig, R., and Milne, R. G. 1981. Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. J. gen. Virol. 54:223-241.
20. Hsu, Y. H. 1984. Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper. Ana. Biochem. 142: 221-225.
21. Karasev, A. V., Nikolaeva, O. V., Koonin, E. V., Gumpf, D. J., and Garnsey, S. M. 1994. Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. J. Gen. Virol.. 75:1415-1422.
22. Kohnen, P. D., Johansen, E. E., and Hampton, R. O. 1995. Characterization and molecular detection of the P4 pathotype of pea seedborne mosaic potyvirus. Phytopathology 85:789-793.
23. Kurstak, E. (ed.) 1981. Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis. Elsevier/North Holland Biomedical Press, N. Y. 943 pp.
24. Langeveld, S. A., Dore, J. M., Memelink, J., Derks, A. F. L. M., Vlugt, C. I. M. van der, Asjes, C. J., and Bol, J. F. 1991. Identification of potyvirus using the olymerase chain reaction with degenerate primers. J. Gen. Virol. 72:1531-1541.
25. Lin, N. S., Hsu, Y. H., and Hsu, H. T. 1990. Immunological detection of plant iruses and a mycoplasmalike organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membrane. Phytopathology 80: 824-828.
26. Matthews, R. E. F. 1981. Plant Virology. 2nd Ed. Academic Press, N.Y. 897 pp.
27. Milne, R. G., and E. Luisoni. 1977. Rapid high-resolution immune electron microscopy of virus preparations. *In* K. Maramorosch and H. Koprowski(eds.), Methods in Virology Vol. 6, pp. 265

-281.

28. Morris, T. J., and Dodds, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. Phytopathology 69:854-858.
29. Morris, T. J., Dodds, J. A., Hillman, B., Jordan, R. L., Lommel, S. A., and Tamaki, S. J. 1983. Viral specific dsRNA: Diagnostic value for plant virus disease identification. Pl. Mole. Bio. Rept. 1:27-30.
30. Nicolas, O., and Laliberte, J. F. 1991. The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. J. Virol. Methods. 32:57-66.
31. O'Donnell, I. J., Shukla, D. D., and Gough, K. H. 1982. Electro-blot radioimmunoassay of virus -infected plant sap- a powerful new technique for detecting plant viruses. J. of Virol. Methods 4:19- 26.
32. Purcifull, D. E., and Batchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with soudium dodecyl sulfate (SDS) treated plant viruses and plant viral inclusions. Fla. Agr. 0Exp. Sta. Tech. Bull. 788, 39 pp.
33. Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D., and Gillings, M. R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. J. Gen. Virol.. 78:2099-2103.
34. Rush, C. M., French, R., and Heidel, G. B. 1994. Differentiation of two closely related furoviruses using the polymerase chain reaction. Phytopathology. 84:1366-1369.
35. Shukla, D. D., McKern, N. M., Gough, K. H., Tracy, S. L., and Letho, S. G. 1988. Differentiation of potyviruses and their strains by high performance liquid chromatographic peptide profiling of coat proteins. J. of Gen. Virology 69:493- 502.
36. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. P. N. A. S. USA 76: 4350-4354.
37. Tsuda, S., Kameya-Iwaki, M., Hanada, K., Fujidawa, I., and Tomaru, K. 1993. Simultaneous diagnossi for plants infected with multiple viruses employing rapid immunofilter paper assay (RIPA) with two-step method; multi-RIPA. Ann. Phytopath. Soc. Japan 50:200-203.
38. Tsuda, S., Kameya-Iwaki, M., Hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., and Tomaru, K. 1992. A novel detection and identification technique for plant viruses: Rapid immunofilter paper assay (RIPA). Plant Dis. 76:466-469.
39. Van Regenmortel, M. H. V. 1982. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, N. Y. 302 pp.
40. Wetzel, T., Tavert, G., Teycheney, P. Y., Ravelonandro, M., Candresse, T., and Dunez, J. 1990. Dot hybridization detection of plum pox virus using 32P- labelled RNA probes representing non-structured viral protein genes. J. of Virol. Methods 30:161-172.

Techniques for Diagnosis and Identification of Plant Viruses

Chin-An Chang
Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Abstract

In recent years, international trade of agricultural products has never been so frequent ever due to the fast developing transportation system in the world. It is, therefore, imperative for each country to adopt adequate quarantine procedures to prevent the invasion of foreign pests or diseases. The ispection of fungal or bacterial diseases may be easier than that of viral ones because of the visibility of the symptom of the causal agents by microscopy. Detection of viruses in plant materials, however, are not reliable based only by symptomatology. Many factors may affect the appearance of visible symptoms so that it is necessary to apply some more sensitive techniques to diagnosis or identify a viral diseases. In the old days, diagnosis of plant virus diseases has to go through a series of procedures such as isolation, growing out for symptom reading and indicator plant inoculation. These procedures usually are time, space and labor comsuming that do not meet the requirement for efficiency in quarantine process. Since 1950s, people have recognized the urgent needs of more sensitive and efficient techniques than the traditional symptom reading ones to detect and identify plant viruses. This paper lists and discusses the advantages and shortcomings of various techniques developed since 1950s for this purpose. Emphasis shoud be made here that no single technique can dominate others in every situations. In other words, each technique may be suitable for some but not all situations. Therefore, specific techniques must be designed and tested to deal with the requirement of each specific situations.

Key words: virus, plant viruses, diagnosis, identification.